

<b>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>5</sup> :</b> <b>C07K 3/08, 17/06 // , G01N 33/53</b> <b>A61K 47/48</b>	<b>A1</b>	<b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: -- WO 92/12995</b> <b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 6. August 1992 (06.08.92)</b>
<b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/EP91/01916 <b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 8. Oktober 1991 (08.10.91) <b>(30) Prioritätsdaten:</b> P 41 01 394.8 18. Januar 1991 (18.01.91) DE <b>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):</b> MEDOR LABORATORIEN FÜR BIOCHEMIE UND KLINI- SCHE CHEMIE GMBH [DE/DE]; Arzbergerstraße 5, D-8036 Herrsching (DE). <b>(72) Erfinder; und</b> <b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):</b> GEIGER, Reinhard [DE/ DE]; Dillizer Straße 31, D-8036 Herrsching (DE). SCHNELLER, Maximilian [DE/DE]; Südliche Auf- fahrtsallee 54, D-8000 München 19 (DE).		<b>(74) Anwälte:</b> KÖSTER, Hajo usw. ; Jaeger, Lorenz & Köster, Pippinplatz 4a, D-8035 Gauting b.München (DE).  <b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> AT (europäisches Patent), BE (euro- päisches Patent), CA, CH (europäisches Patent), DE (europäisches Patent), DK (europäisches Patent), ES (europäisches Patent), FR (europäisches Patent), GB (europäisches Patent), GR (europäisches Patent), IT (eu- ropäisches Patent), JP, LU (europäisches Patent), NL (europäisches Patent), SE (europäisches Patent), US.  <b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>
<b>(54) Title:</b> PROCESS FOR COUPLING CARBOHYDRATES TO SUBSTRATES <b>(54) Bezeichnung:</b> VERFAHREN ZUM KOPPELN VON KOHLENHYDRATEN AN TRÄGER <b>(57) Abstract</b> <p>A process is prepared for coupling carbohydrates or compounds containing a carbohydrate unit to substrates, especially proteins. In this process, use is made in the first stage of a carbohydrate having a free or hemiacetally bonded aldehyde group, or a compound whose carbohydrate unit has such an aldehyde group. This aldehyde group is reductively aminated. Via the amino group thus introduced into the carbohydrate or carbohydrate unit, an organic coupling component bearing a thiol group is bonded so as to form a carbohydrate-coupling component conjugate. The carbohydrate-coupling component conjugate thus formed is coupled in a second stage via the thiol group to a couplable substrate so that the conjugate is covalently bonded to the substrate via a disulphide group or a thioether bridge. The modified substrates of the invention to which a carbohydrate is coupled can be used for immunological purposes, in biochemical analysis and in patho-biochemistry.</p> <b>(57) Zusammenfassung</b> <p>Es wird ein Verfahren zum Koppeln von Kohlenhydraten oder Verbindungen, die eine Kohlenhydrateinheit enthalten, an Träger, insbesondere Proteine, bereitgestellt. Bei diesem Verfahren wird in der ersten Stufe ein Kohlenhydrat, das über eine freie oder halbacetalisch gebundene Aldehydgruppe verfügt, oder eine Verbindung eingesetzt, deren Kohlenhydrateinheit eine derartige Aldehydgruppe besitzt. Diese Aldehydgruppe wird reduktiv aminiert. Über die dabei in das Kohlenhydrat oder die Kohlenhydrateinheit eingeführte Aminogruppe wird ein eine Thiolgruppe tragendes organisches Kopplungsglied daran gebunden, wobei ein Kohlenhydrat-Kopplungsglied-Konjugat gebildet wird. Das so entstandene Kohlenhydrat-Kopplungsglied-Konjugat wird über die Thiolgruppe in einer zweiten Stufe an einen Kopplungsfähigen Träger gekoppelt, so daß das Konjugat über eine Disulfidgruppe oder eine Thioetherbrücke kovalent an den Träger gebunden wird. Die erfindungsgemäß modifizierten Träger, an die ein Kohlenhydrat gekoppelt wurde, können für immunologische Zwecke, in der biochemischen Analytik und in der Pathobiochemie eingesetzt werden.</p>		

# **LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	FI	Finnland	MN	Mongolei
AU	Australien	FR	Frankreich	MR	Mauritanien
BB	Barbados	GA	Gabon	MW	Malawi
BE	Belgien	GB	Vereinigtes Königreich	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GN	Guinea	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	GR	Griechenland	PL	Polen
BJ	Benin	HU	Ungarn	RO	Rumänien
BR	Brasilien	IE	Irland	RU	Russische Föderation
CA	Kanada	IT	Italien	SD	Sudan
CF	Zentrale Afrikanische Republik	JP	Japan	SE	Schweden
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SN	Senegal
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SU	Soviet Union
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	TD	Tschad
CM	Kamerun	LK	Sri Lanka	TG	Togo
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	US	Vereinigte Staaten von Amerika
DE*	Deutschland	MC	Monaco		
DK	Dänemark	MG	Madagaskar		
ES	Spanien	ML	Mali		

## Verfahren zum Koppeln von Kohlenhydraten an Träger

10

### BESCHREIBUNG

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Koppeln von Kohlenhydraten, die über eine freie oder halbacetalisch gebundene Aldehydgruppe verfügen, an Träger, insbesondere Proteine.

Häufig besteht der Wunsch danach, Kohlenhydrate oder Kohlenhydratstrukturen an einen Träger koppeln zu können. Bei diesem Träger handelt es sich beispielsweise um Proteine.

Bei den bisher bekannten Verfahren sind die Ausbeuten jedoch gering. Zudem ist die Auftrennung der erhaltenen Komponenten häufig schwierig. Es besteht daher derzeit noch kein effizientes und einfach durchzuführendes Verfahren zur Anbindung von Kohlenhydraten oder von einer Kohlenhydrateinheit aufweisenden Verbindungen an Proteine und andere Träger.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, ein einfaches Koppelungsverfahren zur Anbindung von Kohlenhydraten oder Kohlenhydratstrukturen an Proteine und andere Träger bereitzustellen.

Gelöst wird diese Aufgabe durch die Lehre des Anspruchs 1.

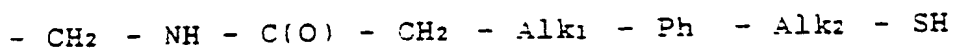
Beim erfindungsgemäßen Verfahren setzt man somit ein Kohlenhydrat, das über eine freie oder halbacetalisch gebundene Aldehydgruppe verfügt, oder eine Verbindung ein, die eine Kohlenhydrateinheit mit einer derartigen Aldehydgruppe besitzt.

Der Kern des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht darin, daß man diese Aldehydgruppe reduktiv aminierte und die dabei in das Kohlenhydrat oder in die Kohlenhydrateinheit eingeführte Aminogruppe an ein eine Thiol-Gruppe tragendes, organisches  
5 Kopplungsglied bindet, wobei ein Kohlenhydrat-Kopplungsglied-Konjugat gebildet wird. Diese Umsetzung kann man in einem oder zwei Schritten durchführen.

Bei der Umsetzung in zwei Schritten reduziert man im ersten Schritt die Carbonylgruppe zu einer  $-CH_2-NH_2$ -Gruppe (reduktive  
10 Aminierung). Die reduktive Aminierung führt man vorzugsweise in Anwesenheit einer Quelle für Ammoniumionen durch, beispielsweise Ammoniumsalzen oder wässrigem Ammoniak. Als Ammoniumsalze setzt man dabei vorzugsweise solche ein, die leicht sauer (pH 4 - 7) reagieren, beispielsweise Ammonium-  
15 chlorid und -acetat.

Bei der reduktiven Aminierung arbeitet man vorzugsweise im leicht saurem Milieu (pH 4-7).

Im Anschluß an die reduktive Aminierung amidiert man dann die so erhaltene  $-CH_2-NH_2$ -Gruppe unter Einführung einer eine  
20 Thiol-Gruppe tragenden Gruppe der folgenden Formel:



worin  $Alk_1$  und  $Alk_2$  unabhängig voneinander für eine direkte Bindung oder für eine gerade oder verzweigte Alkylen-Gruppe mit 1 bis 20 C-Atomen, insbesondere 1 bis 6 C-Atomen und wei-  
25 terhin insbesondere 1 bis 4 C-Atomen, stehen, wobei die Summe der C-Atome in den Alkylen-Gruppen  $\leq 20$  ist und die Alkylen-Gruppen unabhängig voneinander durch Halogen und  $-NO_2$  mono- oder polysubstituiert sein können, Ph für eine direkte Bindung oder ein Phenyl-Gruppe steht, wobei die Phenyl-Gruppe  
30 durch Halogen,  $-NO_2$  oder eine  $C_1-C_6$  Alkyl-Gruppe mono- oder polysubstituiert sein kann.

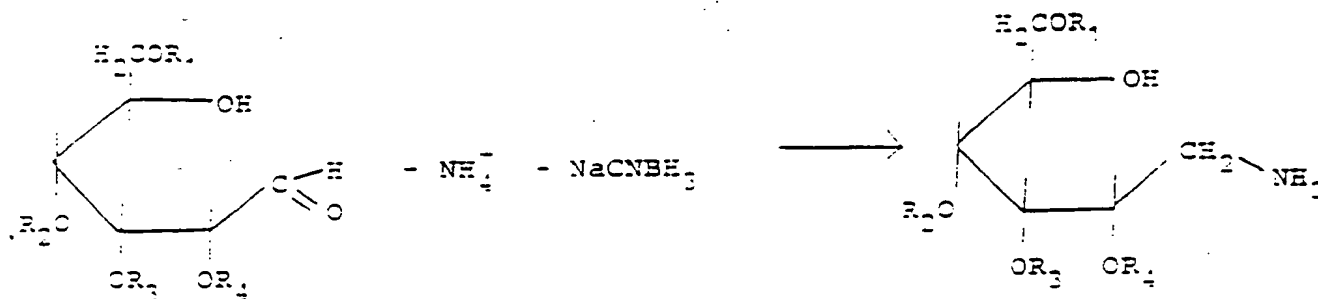
Diese Amidierung kann man beispielsweise gemäß der von J. Carlson et al im Biochemical Journal 1978, 173, S. 723 - 737 beschriebenen Arbeitsweise durchführen. Vorzugsweise setzt man

dabei SPDP (N-Succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionat) ein. Bei Verwendung von SPDP überführt man die  $-\text{CH}_2-\text{NH}_2$ -Gruppe in eine  $\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{SH}$ -Gruppe. Ersetzt man im SPDP-Molekül die  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2$ -Einheit (die Formel von SPDP ist in den Beispielen gezeigt) durch eine oben beschriebene

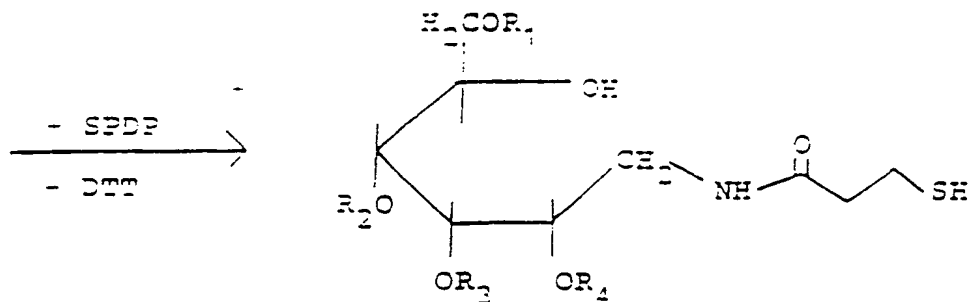
$-\text{CH}_2 - \text{Alk}_1 - \text{Ph} - \text{Alk}_2 - \text{Einheit}$ , dann kann man mit dem so modifizierten Molekül die  $-\text{CH}_2-\text{NH}_2$ -Gruppe in die anderen oben näher erläuterten, eine Thiol-Gruppe tragenden Gruppen der folgenden Formel

10  $-\text{CH}_2 - \text{NH} - \text{C}(\text{O}) - \text{CH}_2 - \text{Alk}_1 - \text{Ph} - \text{Alk}_2 - \text{SH}$   
überführen.

Die mit Hilfe von SPDP durchgeführte Umsetzung ist im nachstehenden Reaktionsschema näher erläutert.



2./3. Zeile von Schema



Wie aus obigem Reaktionsschema ersichtlich ist, setzt man bei der Amidierung auch ein mildes Reduktionsmittel, beispielsweise Mercaptoethanol oder DTT (Dithioerythrit), ein, um die bei der Amidierung eingeführte Sulfhydrylgruppe in der reduzierten Form zu erhalten bzw. zu halten.

Bei den im oben gezeigten Reaktionsschema aufgeführten Resten  $\text{R}_1$  bis  $\text{R}_4$  kann es sich um beliebige Reste und um für Kohlenhydrate bzw. Kohlenhydrateinheiten übliche Reste handeln.

Bei der oben beschriebenen, aus zwei Schritten bestehenden Umsetzung erhält man dann ein Kohlenhydrat-Kopplungsglied-Konjugat. Das Kohlenhydrat kann dann, wie weiter unten näher erläutert ist, über das eingeführte Kopplungsglied an einen Träger gebunden werden.

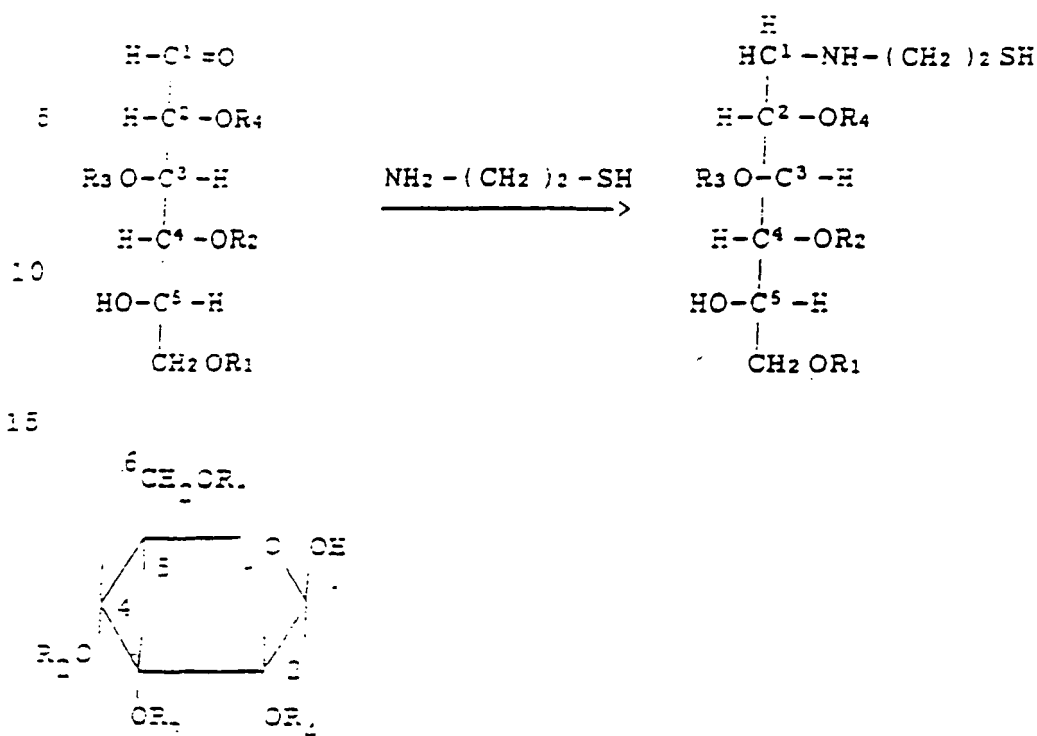
Ein derartiges Kohlenhydrat-Kopplungsglied-Konjugat kann man auch in einer einstufigen Umsetzung erhalten. Dazu setzt man das Kohlenhydrat bzw. die ein Kohlenhydrat enthaltende Verbindung mit einer sowohl eine Thiol-Gruppe als auch eine Amino-Gruppe tragenden, organischen, als Kopplungsglied fungierenden Verbindung unter reduktiver Aminierung der Aldehyd-Gruppe durch diese Aminogruppe um. Somit findet auch in diesem Fall eine reduktive Aminierung der Aldehyd-Gruppe des Kohlenhydrats bzw. der Kohlenhydrateinheit statt. Da die Aminogruppe jedoch an eine organische Moleküleinheit gebunden ist, wird diese Moleküleinheit gleichzeitig mit in das Kohlenhydrat eingeführt. Vorzugsweise setzt man dabei eine Verbindung der folgenden allgemeinen Formel I ein:



worin B eine divalente organische Moleküleinheit bedeutet, die sowohl die genannte Aminogruppe als auch die genannte Thiol-Gruppe trägt und als Spacer-Einheit dient. Man kann auch ein Dimeres dieser Verbindung der allgemeinen Formel I zur Anwendung bringen. Am meisten bevorzugt setzt man Cysteamin, insbesondere in Form eines Hydrochlorids, ein.

Diese aus einem Schritt bestehende Umsetzung ist im nachstehenden Reaktionsschema unter Verwendung von Cysteamin erläutert. Die Darstellung anhand der Umsetzung mit Cysteamin geschieht lediglich aus Zwecken der einfacheren Darstellbarkeit und soll keine Beschränkung darstellen.

3



In der ersten Stufe des erfindungsgemäßen Verfahrens und somit sowohl in der oben beschriebenen Umsetzung in einem Schritt als auch in der Umsetzung in zwei Schritten wird die Carbonyl-

30 Gruppe durch eine Amino-Gruppe reduktiv aminierte. Die Amino-Gruppe kann dabei als freie Amino-Gruppe oder als eine an eine organische Moleküleinheit gebundene Gruppe eingeführt werden. Im Falle der freien Amino-Gruppe amidiert man diese unter Einführung einer eine Thiol-Gruppe aufweisenden Gruppe. Diese

35 Gruppe bzw. Moleküleinheit dient als Spacer-Einheit und trägt eine Thiol-Gruppe, über die das erhaltene Kohlenhydrat-Kopplungsglied-Konjugat (wird nachstehend erläutert) an einen Träger gekoppelt wird. Diese Spacer-Einheit dient somit als Kopplungsglied des Kohlenhydrats an einen Träger.

40 Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren wird somit in der ersten Stufe eine freie -SH-Gruppe in das Kohlenhydrat bzw. in die Kohlenhydrateinheit eingeführt.

Wird die erste Stufe des erfindungsgemäßen Verfahrens in zwei Schritten durchgeführt, dann wird die Einführung eines basis-

45 schen Zentrums in das Kohlenhydrat bzw. in die Kohlen-

hydrateinheit am anomeren Kohlenstoffatom vermieden. Die im ersten Schritt erhaltenen reduktiv aminierten Kohlenhydrate können durch Gelchromatographie isoliert werden.

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren kann eine Thiol-Gruppe nicht nur in "normale" Kohlenhydrate, beispielsweise Monosaccharide, Disaccharide und Oligosaccharide, sondern in alle solche Verbindungen eingeführt werden, die eine Kohlenhydratstruktur besitzen, sofern das Kohlenhydrat oder die Kohlenhydratstruktur bzw. -einheit eine freie oder halbacetalisch gebundene Aldehydgruppe besitzt. Diese Aldehydgruppe kann sich im übrigen auch in einer Seitenkette des Kohlenhydrats befinden. Auch kann diese Aldehydgruppe eingeführt sein, beispielsweise durch Oxidation. Entscheidend ist lediglich, daß diese Aldehydgruppe in der Lage ist, durch die Amino-Gruppe der als Kopplungsglied eingesetzten Verbindung reduktiv aminiert zu werden, wobei sich eine  $-CH_2-NH$ -Bindung bildet.

Als Verbindungen für die Umsetzung in einem Schritt, die als Kopplungsglied fungieren können und sowohl eine Thiol-Gruppe als auch eine Amino-Gruppe tragen, können die vielfältigsten Verbindungen eingesetzt werden. Dies hat seine Ursache darin, daß die organische Moleküleinheit zwischen der Amino-Gruppe und der Thiol-Gruppe lediglich als Spacereinheit oder als "Abstandseinheit" dient. Zweckmäßigerweise setzt man eine möglichst inerte Spacereinheit (beispielsweise eine Alkylengruppe mit 1 bis 20, insbesondere 2 bis 6 Kohlenstoffatomen) ein. Die Spacereinheit kann jedoch auch eine oder mehrere funktionelle Gruppen tragen, Diese sollten natürlich die bei dem erfindungsgemäßen Verfahren stattfindenden Reaktionen nicht stören.

Es ist im übrigen auch möglich, ein Dimeres der als Kopplungsglied dienenden Verbindung zur Anwendung zu bringen. In diesem Fall haben die beiden Thiol-Gruppen von zwei derartigen Verbindungen eine Disulfidbrücke gebildet, die im Anschluß an die reduktive Aminierung aufgespalten wird.

Die erste Stufe des erfindungsgemäßen Verfahrens führt man zweckmäßigerweise in einem Lösungsmittel durch, in dem das Kohlenhydrat löslich ist.

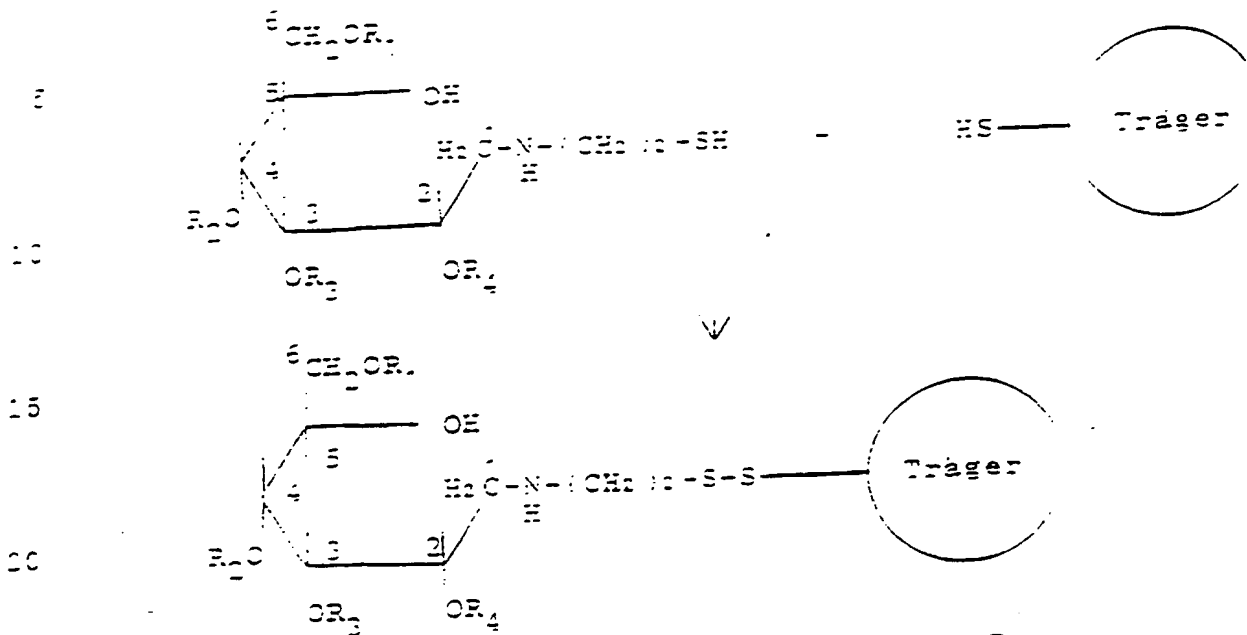


Es darf an dieser Stelle darauf hingewiesen werden, daß der Ausdruck "Kohlenhydrat" sofern er im Rahmen der allgemeinen Ausführungen in Alleinstellung verwendet wird, nicht nur ein "richtiges" Kohlenhydrat, sondern auch die oben näher  
5 erläuterten kohlenhydrathaltigen Strukturen etc. bezeichnet.

Als Lösungsmittel finden zweckmäßigerweise Wasser und Methanol sowie Gemische daraus Anwendung.

Die reduktive Aminierung kann man unter Verwendung von Natriumborhydrid und bevorzugt von Natriumcyanborhydrid durch-  
10 führen.

In der zweiten Stufe des erfindungsgemäßen Verfahrens wird das in der ersten Stufe erhaltene Kohlenhydrat-Kopplungsglied-Konjugat über die eingeführte Thiol-Gruppe, die eine freie Thiol-Gruppe (SH-Gruppe) oder eine aktivierte Thiolgruppe  
15 (wird weiter unten erläutert) sein kann, mit einem kopplungsfähigen Träger umgesetzt und dadurch daran gekoppelt. Der Träger muß dabei in der Lage sein, mit der Thiol-Gruppe des Kohlenhydrat-Kopplungsglied-Konjugates eine Disulfidbrücke oder eine Thioetherbrücke auszubilden, so daß eine kovalente  
20 Bindung gebildet wird. Dies wird in dem nachfolgenden Schema exemplarisch dargestellt:



Die Reste  $\text{R}_1 - \text{R}_4$  im obigen Schema können beliebiger Natur und für Kohlenhydrate übliche Reste sein.

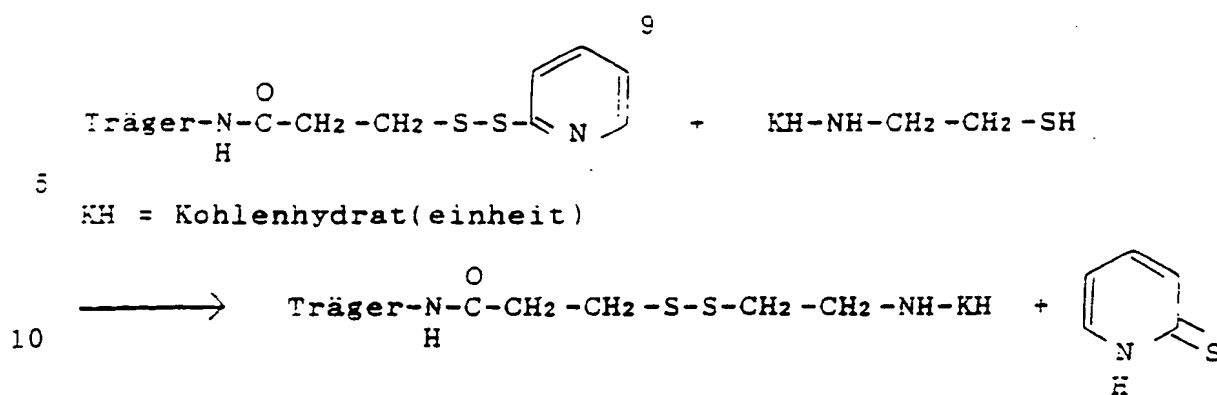
- 25 Die Kopplung von Trägern über Thiol-Gruppen und auch die Modifizierung von Trägermolekülen, so daß sie mit Thiol-Gruppen koppeln können, ist im übrigen bekannt. Eine Übersicht über derartige Kopplungsreaktionen findet sich beispielsweise in *Methods in Enzymology*, Vol. 91 (Academic Press 1983),
- 30 Seiten 580 bis 609.

In dem oben gezeigten Schema entstand durch die Kopplung aus der Thiol-Gruppe des Kohlenhydrat-Kopplungslieds-Konjugats und der Thiol-Gruppe des Trägers eine Disulfidbrücke. Es gibt nun zahlreiche Möglichkeiten, eine derartige Kopplung unter

35 Ausbildung einer Disulfidbrücke vorzunehmen.

So ist es beispielsweise möglich, Träger mit N-Succinimidyl-3-(2-Pyridyldithio)propionat (SPDP) zu aktivieren. Die aktivierte Verbindung wird dann mit einem erfindungsgemäß erhältlich, eine Thiol-Gruppe aufweisenden Kohlenhydrat-Kopplungs-

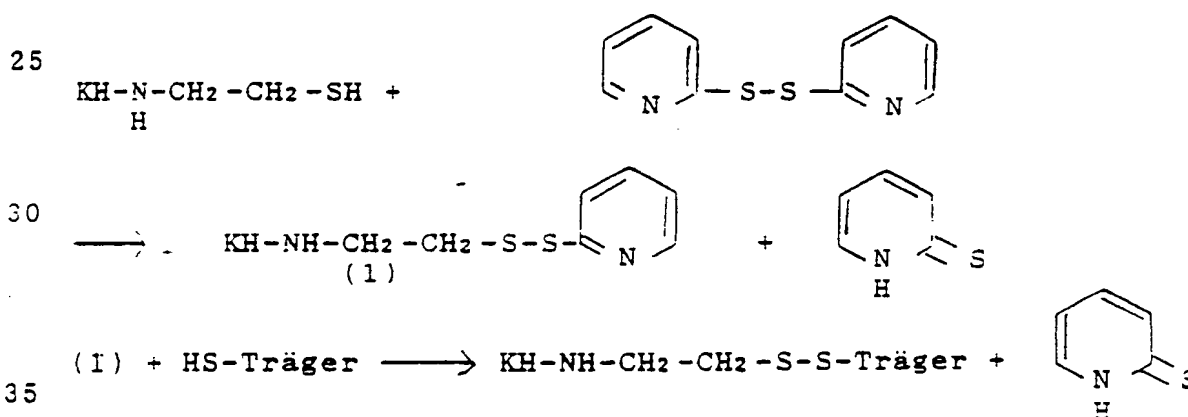
40 glied-Konjugat umgesetzt. Dies ist im nachstehenden Schema erläutert:



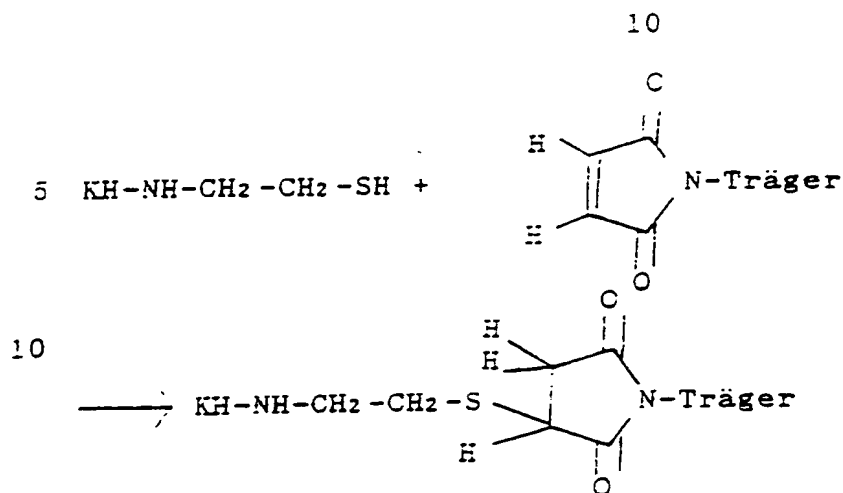
KH = Kohlenhydrat

15 Die oben beschriebene Aktivierung eines Trägers mit SPDP ist im übrigen in der in den nachstehenden Beispielen angeführten Literaturstelle von J. Carlsson (1978) näher erläutert.

Auch ist es möglich, die Thiol-Gruppe des Kohlenhydrat-Kopplungsglied-Konjugats mit 2-Dipyridyl-disulfid oder 4-  
20 Dipyridyl-disulfid zu aktivieren und dann mit einem eine Thiol-Gruppe tragenden Träger umzusetzen gemäß dem nachstehenden Schema:

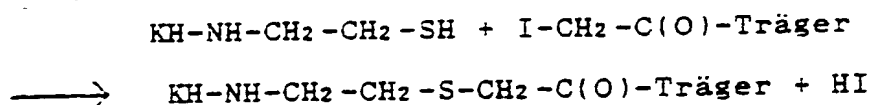


Man kann auch einen Träger einsetzen, der eine Maleinimid-einheit enthält bzw. in den eine derartige Einheit eingeführt worden ist. Bei der Umsetzung mit dem eine Thiol-Gruppe enthaltenden Kohlenhydrat-Kopplungsglied-Konjugat findet dabei  
40 folgende Reaktion statt, die eine Art Michael-Addition darstellt:



In diesem Fall wird somit eine Thioetherbrücke ausgebildet.

- 15 Eine Thioetherbrücke bildet sich auch, wenn man das erfindungsgemäß erhältliche Kohlenhydrat-Kopplungsglied-Konjugat mit einem Träger umsetzt, der durch die Thiol-Gruppe substituiert wird. Das nachfolgende Schema zeigt diesen Reaktionstyp anhand eines eine Jodacetylgruppe tragenden
- 20 Trägers:



- Auch die zweite Stufe des erfindungsgemäßen Verfahrens wird vorzugsweise in einem Lösungsmittel, beispielsweise einer
- 25 wäßrigen Pufferlösung, durchgeführt.

Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht es somit, einerseits Kohlenhydrate derart zu modifizieren, daß sie eine zur Koppelung fähige Thiol-Gruppe aufweisen, und andererseits ein derart modifiziertes Kohlenhydrat an Träger zu koppeln.

- 30 Bei den Trägern kann es sich beispielsweise um Proteine handeln. Diese Proteine mit einem darauf gekoppelten Kohlenhydrat können für Immunisierungszwecke eingesetzt werden. Dabei werden Antikörper unter anderem gegen die Kohlenhydrate gebildet, die man gewünschtenfalls isolieren kann.

- 35 Die entsprechenden Immunisierungsverfahren und Verfahren zur Gewinnung und Isolierung von Antikörpern sind üblicher Natur.

Träger, auf die mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens ein Kohlenhydrat gekoppelt wurde, können auch für die Affinitätschromatographie eingesetzt werden, beispielsweise zur Isolierung und Reinigung von an Kohlenhydrate bindenden Proteinen.

- 5 Eine andere Anwendungsmöglichkeit besteht darin, erfindungsgemäß mit einem Kohlenhydrat gekoppelte, markierte Träger zur Lokalisierung von Kohlenhydrat-bindenden Molekülen einzusetzen. So kann man beispielsweise ein erfindungsgemäß erhältliches Konjugat mit einem Maleinimid-Biotin-Konjugat koppeln und auf diese Weise kohlenhydratbindende Proteine mit Hilfe von Avidin-Enzym-Konjugaten detektieren. Diese Biotin-Konjugate können ferner in der biochemischen Analytik (Lektin-Detektion) und in der Patho-biochemie (Suche von Tumorzellen über tumorspezifische Lecthine) Anwendung finden. Statt Biotin  
10 können auch andere Marker verwendet werden.  
15

Erfindungsgemäß können somit Kohlenhydrate an die verschiedensten Proteine und für die verschiedensten Zwecke gekoppelt werden.

- Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren können auch Kohlenhydratketten in rekombinant hergestellte Protein-Moleküle eingeführt werden.  
20

- Erfindungsgemäß ist es auch möglich, eine Thiol-Gruppe aufweisende und als Kopplungsglied dienende Verbindung in Ganglioside einzuführen und diese so modifizierten Ganglioside an Trägerproteine gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren zu koppeln.  
25

### Beispiele

#### Beispiel 1

##### 1. Stufe

- 30 Reduktive Aminierung von Kohlenhydraten mit Cysteamin (beschrieben am Beispiel von Neuraminyl-Lactose).

Man löst 2,38 mg Neuraminyl-Lactose-Ammoniumsalz (3,66  $\mu\text{mol}$ ), 64 mg Cysteamin-HCl (571  $\mu\text{mol}$ ) und 9 mg NaCNBH<sub>3</sub> (144  $\mu\text{mol}$ ) in

3 ml absolutem Methanol und erhitzt am Rückfluß. Man hält den pH-Wert der Lösung während der Reaktion bei 4 bis 5, wobei man den pH-Wert erforderlichenfalls mit 100%-iger Essigsäure (Kontrolle mit Indikatorpapier) einstellt. Nach 1,5 h gibt man  
5 weitere 7 mg  $\text{NaCNBH}_3$  (112  $\mu\text{mol}$ ) in 0,5 ml Methanol gelöst zu. Nach 4 h engt man den Ansatz im Rotationsverdampfer im Vakuum zur Trockne ein.

Das so erhaltene Neuraminyl-Lactose-Cysteamin-Konjugat reinigt man anschließend mittels Kieselgelchromatographie. Dazu  
10 suspendiert man Kieselgel 60 im Laufmittel 1 (Chloroform : Methanol : Wasser = 25:20:4 ml) und füllt es in eine Glassäule mit Glasfritte (Durchmesser 0,8 cm) bis zu einer Gelhöhe von ca. 18 cm. Den zur Trockne eingedampften Reaktionsansatz löst man in 0,2 ml Wasser und gibt ihn auf die Säule. Man eluiert  
15 die Säule mit Laufmittel 1 und sammelt Fraktionen zu 1 ml. Die erhaltenen Fraktionen untersucht man dünnschichtchromatographisch (DC-System - DC-Platten: Kieselgel 60-HPTLC; Laufmittel: 32%-ige Ammoniaklösung : Ethanol = 40:60). Die DC-Detektion führt man durch, indem man die DC-Platten nach der  
20 Chromatographie zunächst mit einem thiol-spezifischen Detektionsmittel besprüht (8 mg Ellmans-Reagens/10 ml 0,1 mol/l Natriumphosphatpuffer, pH 8), danach kurz erhitzt und anschließend mit Resorcinol-Lösung besprüht.

Als erste Fraktion eluiert man Cysteamin, dann  
25 Natriumcyanborhydrid und schließlich nicht umgesetzte Neuraminyl-Lactose. Sobald man diese Komponenten dünnschichtchromatographisch im Eluat nicht mehr nachweisen kann (nach einem Elutionsvolumen von ca. 20 ml), stellt man auf Laufmittel 2 (32%-ige Ammoniaklösung : Methanol = 40:60) um und  
30 eluiert die Säule damit. Unter diesen Elutionsbedingungen eluiert man reines Neuraminyl-Lactose-Cysteamin-Konjugat von der Säule. Man vereint die betreffenden Fraktionen und engt mit Hilfe eines Rotationsverdampfers im Vakuum ein. Den Rückstand löst man zur Abtrennung störender Ionen in 1 ml 0,1  
35 mol/l Natriumphosphatpuffer, pH 8, und versetzt mit etwas Dithiothreitol (um die Cysteaminkonjugate im reduzierten Zustand zu erhalten). Anschließend eluiert man mit Wasser über eine

Sephadex G-10 Säule (Durchmesser: 1 cm; Länge: 18 cm). Die Fraktionen untersucht man ebenfalls dünnschichtchromatographisch (DC-System wie oben beschrieben) und vereint die entsprechenden Fraktionen und lyophilisiert.

- 5 Zur Ausbeutebestimmung quantifiziert man das Lyophilisat, indem man mit Hilfe des Resorcinol-Tests die Anzahl von Sialinsäure und mit Hilfe von Ellmans-Reagens die Anzahl von Thiol-Gruppen bestimmt. Es ergibt sich ein Wert von 1,53  $\mu\text{mol}$  für Sialinsäure und 1,45  $\mu\text{mol}$  für Thiol; Gesamtausbeute 40%  
10 bezogen auf Thiol.

## 2. Stufe

Kopplung des in der ersten Stufe erhaltenen Kohlenhydrat-Cysteamin-Konjugats an Träger (dargestellt am Beispiel von Neuraminyllactose-Cysteamin und bovinem Serumalbumin).

- 15 Man setzt bovines Serumalbumin (BSA) mit SPDP (J. Carlsson et al. (1978) Biochem. J. 173, 723 - 737; Protein Thiolation and Reversible Protein-Protein Conjugation, N-Succinimidyl 3-(2-Pyridyldithio) propionate, a new heterobiofunctional reagent; SPDP) um, so daß etwa 20 SPDP-Moleküle an 1 BSA-Molekül gebunden werden.  
20

- Zur Kopplung des Kohlenhydrat-Cysteamin-Konjugats an BSA verfährt man wie folgt: man löst 0,43 mg Neuraminyllactose-Cysteamin-Konjugat und 1 mg BSA-SPDP in 0,7 ml Puffer (0,1 mol/l Phosphatpuffer; pH 7,5; enthält 0,1 mol/l NaCl; molares  
25 Verhältnis von Neuraminyllactose-Cysteamin-Konjugat zu BSA = 40:1) und inkubiert 18 h bei 37° C. Danach gibt man den Reaktionsansatz auf eine Sephadex G-100 Säule (2 cm x 17 cm) und eluiert mit Wasser. Man sammelt Fraktionen von 1 ml. Die Elution verfolgt man dünnschichtchromatographisch und über die  
30 Extinktion bei 280 nm. Man eluiert das Kohlenhydrat-Cysteamin-BSA-Konjugat im Ausschlußvolumen der Säule, gut abgetrennt vom restlichen nicht umgesetzten Kohlenhydrat-Cysteamin-Konjugat, das man für eine weitere Kopplung je nach Bedarf verwenden kann.

Das Produkt wurde anschließend hinsichtlich des molaren Verhältnisses von Sialinsäure zu Albumin mit Hilfe des Resorcinol-Tests bzw. durch Messung der Absorption bei 280 nm (unter Berücksichtigung von nicht umgesetzten SPDP-Gruppen) analysiert. Es ergab sich ein Wert von 16 Sialinsäure-Resten pro BSA-Molekül sowie von 4 am BSA-Molekül noch verbleibenden, nicht umgesetzten SPDP-Gruppen.

Gemäß dem oben beschriebenen Beispiel ist es auch möglich, Lactose an den Träger zu koppeln. Dabei setzt man 10 mg Lactose (entspricht 27,8  $\mu\text{Mol}$ ), 142 mg Cysteamin (entspricht 1270  $\mu\text{Mol}$ ), 10 mg  $\text{NaCNBH}_3$  (entspricht 160  $\mu\text{Mol}$ ) ein. Man arbeitet dabei in 3 ml  $\text{H}_2\text{O}$  bei pH ca. 5. Man erhitzt dabei 4 h bis ca. 80°C am Rückfluß, wobei man den pH-Wert bei 4 bis 5 hält. Die Aufarbeitung erfolgt wie bei der in der zweiten Stufe im obigen Beispiel beschriebenen Aufarbeitung der Neuraminylactose. Die Ausbeute beträgt ca. 50 %. Die Kopplung an den Träger erfolgt dann wie oben für Neuraminyl-Lactose beschrieben.

#### Beispiel 2

Reduktive Aminierung von Kohlenhydraten mit Cysteamin erläutert am Beispiel von N-Acetyl-Neuraminylactose:

Man löst 2,4 mg N-Acetyl-Neuraminylactose (3,7  $\mu\text{Mol}$ ), 64 mg Cysteamin-HCl (571  $\mu\text{Mol}$ ) und 9 mg  $\text{NaCNBH}_3$  (140  $\mu\text{Mol}$ ) in 3 ml absolutem Ethanol und erhitzt am Rückflußkühler auf 70°C. Der pH-Wert der Lösung beträgt etwa 5 (Kontrolle mit Indikatorpapier). Nach 2,5 h engt man die Reaktionslösung im Rotationsverdampfer unter Vakuum ein und löst den Rückstand in 2 ml Wasser. Man gibt etwas DTT zur Lösung, um die Sulfhydryl-Gruppen in der reduzierten Form zu halten. Die Lösung gibt man anschließend über eine mit 0,02 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , pH 11, äquilibrierte Sephadex G-10-Säule (2 cm x 20 cm), um das überschüssige Cysteamin abzutrennen. Man sammelt Fraktionen von 2 ml, die einer Dünnschichtchromatographie im Laufmittelsystem: ( $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O} = 60:40:9$  ml) unterworfen werden und mit Hilfe des Resorcinol-Sprühreagens auf N-Acetyl-Neuraminyl-lactosyl-Cysteamin (NLC) geprüft wird. Unter diesen Bedingun-



gen ist NLC als lila Fleck am Start sichtbar, während die Ausgangsverbindung, d.h. N-Acetyl-Neuraminyllactose, etwa einen Rf-Wert von 0,5 besitzt. Man prüft die Fraktionen anschließend mit Hilfe des Ninhydrin-Reagenz auf unreaktiertes Cysteamin, das mit einem violetten Fleck bei einem Rf-Wert von 0,1 sichtbar wird.

Man vereint die NLC-haltigen Fraktionen, stellt den pH-Wert mit  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  auf ca. 7,5 ein und konzentriert in einem Rotationsverdampfer bei maximal 30° C auf etwa 4 ml. Die Gesamtmenge an NLC bestimmt man mittels Ellmans Reagens (Ausbeute 60%). Die Lösung kann in dieser Form zur Kupplung an einen geeigneten Träger verwendet werden, wie dies im Beispiel 1 beschrieben ist.

### Beispiel 3

Reduktive Aminierung von Kohlenhydraten mit einer Quelle für Ammoniumionen und anschließende Amidierung mit N-succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)propionat (SPDP), erläutert am Beispiel von Monosialogangliotetraose, der Kohlenhydratstruktur von Gangliosid GM1 (erhalten durch Ozonolyse von GM1; Schwarzmann et al. Methods of Enzymol. 1987, 138, S. 319 - 314).

Man löst 1 mg Monosialogangliotetraose (1  $\mu\text{l}$ ), 56 mg Ammoniumacetat (727  $\mu\text{mol}$ ) und 10 mg  $\text{NaCNBH}_3$  (156  $\mu\text{mol}$ ) in 3 ml absolutem Methanol und erhitzt am Rückflußkühler auf 70° C. Der pH-Wert der Lösung beträgt etwa 5 (Kontrolle mit Indikatorpapier). Nach 2h stellt man die Reaktionslösung mit einer 0,1 ml NaOH-Lösung auf einen pH-Wert von 11 ein, engt im Vakuum ein und löst den Rückstand in 2 ml Wasser. Man gibt die Lösung anschließend über eine mit 0,02 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , pH 11, äquilibrierte Sephadex G-10 Säule (2 cm x 20 cm) und sammelt Fraktionen von 2 ml. Diese unterwirft man einer Dünnschichtchromatographie im Laufmittelsystem 1 (man vergleiche Beispiel 2) und prüft mit Hilfe des Resorcinol-Sprühreagenz auf 1-Desoxy-1-amino-monosialogangliotetraose. Unter diesen Bedingungen ist das Reaktionsprodukt als lila Fleck am Start sichtbar, während die Ausgangsverbindungen, Monosialogangliotetraose, etwa einen Rf-Wert von ca. 0,4 besitzen. Die Frak-

tionen prüft man anschließend mit Hilfe des Ninhydrin-Reagenz auf noch vorhandenes Ammoniumacetat, das mit einem violetten Fleck bei einem Rf-Wert von ca. 0,1 sichtbar wird.

Man vereint die 1-Desoxy-1-amino-monosialogangliotetraose-  
5 haltigen Fraktionen, stellt mit  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  auf einen pH-Wert von ca. 7,5 ein und konzentriert mittels eines Rotationsverdampfers bei maximal 30° C auf etwa 2 ml. Zu dieser Lösung gibt man SPDP (in Ethanol gelöst) im zweifach molaren Überschuß zu und läßt das Reaktionsgemisch 1 h bei Raumtemperatur  
10 stehen. Dann versetzt man mit etwas DTT und unterzieht die Lösung wiederum einer Gelfiltration an Sephadex G-10 (siehe oben). Man sammelt Fraktionen von 2 ml und untersucht mittels Dünnschichtchromatographi im Laufmittelsystem 1 und Resorcinol-Reagenz auf das Reaktionsprodukt, das einen Rf-Wert von  
15 ca. 0,2 besitzt. Man vereint die entsprechenden Fraktionen und engt mit Hilfe eines Rotationsverdampfers bei maximal 30° C auf ein Volumen von ca. 2 ml ein. Die Lösung kann in dieser Form zur Kopplung an einen geeigneten Träger verwendet werden.

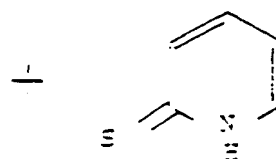
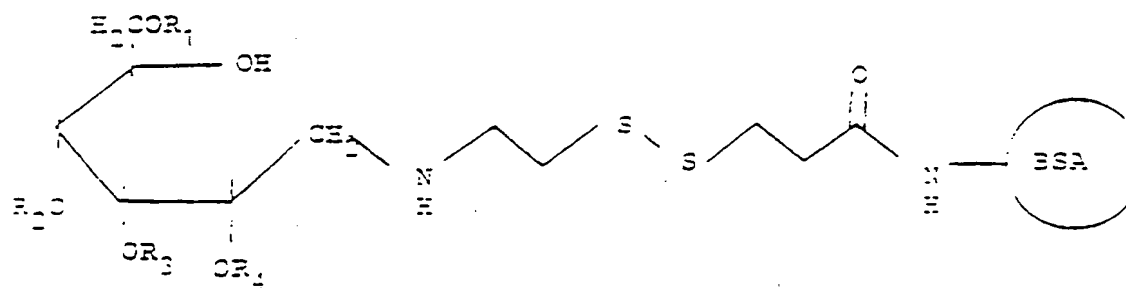
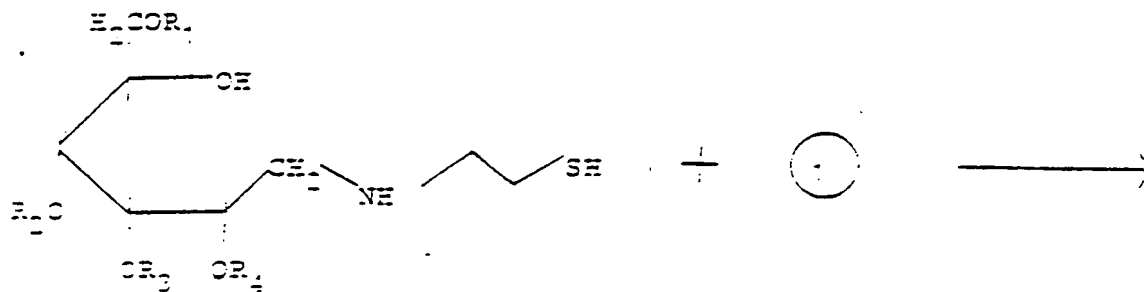
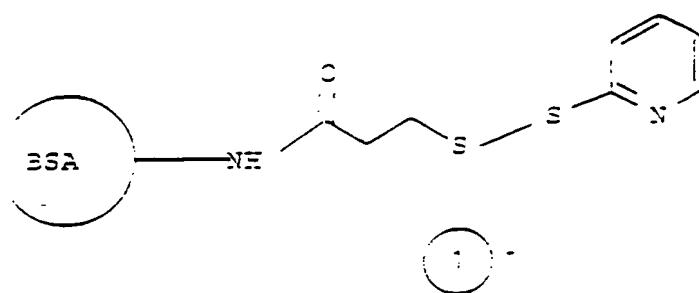
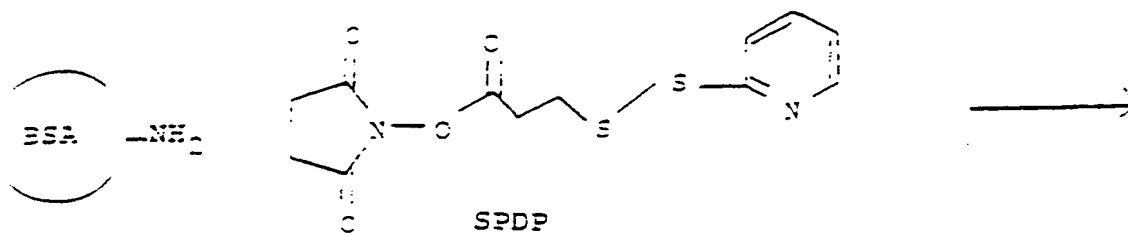
#### Beispiel 4

20 Kopplung von Kohlehydrat-Cysteamin-Konjugaten an Proteine, erläutert am Beispiel von Neuraminyllactose-Cysteamin und Bovinem Serumalbumin

Bovinus Serumalbumin (BSA) wurde auf per se bekannte Weise mit SPDP versetzt, so daß etwa 12 Pyridyldisulfidgruppen an 1 BSA-  
25 Molekül gebunden wurden. Die Kopplung des Kohlehydrat-Cysteamin-Konjugats erfolgt in einem 0,1 molaren Phosphatpuffer, pH 7,5 + 0,1 NaCl, im molaren Verhältnis von 1,25 : 1 (Neuraminyllactose-Cysteamin : Pyridyldisulfidgruppen). Die Menge der bei der Reaktion freigesetzten Pyridylthionmoleküle  
30 ist äquivalent der Menge an gekoppeltem Kohlenhydrat-Cysteamin-Konjugat, so daß der Reaktionsverlauf durch Beobachtung des Absorptionsverlaufes bei 343 nm mitverfolgt werden kann (erfolgt in Aliquoten). Nach etwa 4 h entspricht die Absorption bei 343 nm der Gesamtmenge an theoretisch freisetzbaren Pyridylthionmolekülen ( $\epsilon = 8,08 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ ). Der  
35 Reaktionsansatz wird über eine Sephadex G-75 Säule (1 cm x 20

cm, im Reaktionspuffer äquibriert) in Neoglycoprotein und niedermolekulare Bestandteile aufgetrennt. Man vereinigt die proteinhaltigen Fraktionen und analysiert das erhaltene Neoglycoprotein. Bei der Quantifizierung von Neuraminsäure  
5 (mittels Resorcinoassay) und Protein (mittels Pierce BCA-Assay) ergibt sich ein Wert von 12 Neuraminsäuren je BSA-Molekül. Somit sind alle vorhandenen Pyridyldisulfid-gruppen umgesetzt. Die hier beschriebene Kopplung ist anhand des nachstehend gezeigten Reaktionsschemas näher erläutert.

18



$\lambda_{\text{max}} = 340 \text{ nm}$

## PATENTANSPRUCHE

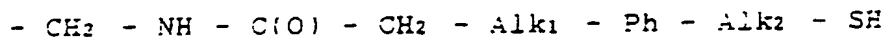
1. Verfahren zum Koppeln von Kohlenhydraten oder von Verbindungen, die eine Kohlenhydrateinheit enthalten, an Träger, insbesondere Proteine, dadurch gekennzeichnet, daß man
- ein Kohlenhydrat, das über eine freie oder halbacetalisch gebundene Aldehydgruppe verfügt, oder eine Verbindung, deren Kohlenhydrateinheit eine derartige Aldehydgruppe besitzt, einsetzt,
- a) in einer ersten Stufe diese Aldehydgruppe reduktiv aminiert und das Kohlenhydrat oder die Kohlenhydrateinheit über die dabei eingeführte Aminogruppe an ein eine Thiol-Gruppe tragendes, organisches Kopplungsglied bindet, wobei ein Kohlenhydrat-Kopplungsglied-Konjugat gebildet wird, und
- b) in einer zweiten Stufe dieses so gebildete Konjugat mit einem kopplungsfähigen Träger derart zur Reaktion bringt, daß das Konjugat über seine Thiol-Gruppe unter Ausbildung einer Disulfidbrücke oder einer Thioetherbrücke kovalent an den Träger gebunden wird.

## 2. Verfahren nach Anspruch 1.

dadurch gekennzeichnet,

daß man in der ersten Stufe a) die Aldenhydratgruppe

a1) mit einer Quelle für Ammoniumionen in die

-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>-Gruppeüberführt und dann die erhaltene -CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>-Gruppe zu einer  
eine Thiol-Gruppe tragenden Gruppe der folgenden Formel:

worin

Alk<sub>1</sub> und Alk<sub>2</sub> unabhängig voneinander für eine direkte  
Bindung oder für eine gerade oder verzweigte Alkylen-  
Gruppe mit 1 bis 20 C-Atomen, insbesondere 1 bis 6C-Atomen, stehen, wobei die Summe der C-Atome in den  
Alkylen-Gruppe ≤ 20 ist und die Alkylen-Gruppenunabhängig voneinander durch Halogen und -NO<sub>2</sub> mono- oder  
polysubstituiert sein können,

Ph für eine direkte Bindung oder ein Phenyl-Gruppe

steht, wobei die Phenyl-Gruppe durch Halogen, -NO<sub>2</sub> oder  
eine C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> Alkyl-Gruppe mono- oder polysubstituiert sein  
kann, amidiert oder

a2) mit einer Verbindung der allgemeinen Formel I:

worin B eine divalente organische Moleküleinheit bedeutet,  
die als Spacereinheit dient, oder einem Dimeren dieser

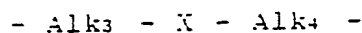
Verbindung, umgesetzt.

## 3. Verfahren nach Anspruch 2,

dadurch gekennzeichnet,

daß man eine Verbindung der allgemeinen Formel I ein-

setzt, worin B eine gerade oder verzweigte Alkylen-Gruppe

mit 1 bis 20 C-Atomen bedeutet oder für folgende allge-  
meine Formel steht:

worin

X für eine Phenyl-Gruppe, -NH-NH-, -S-S-, -C(O)-O-,  
-C(O)-N-, -S(O)-, -S(O)<sub>2</sub>-, -C(OH, H)-, oder -C(NH<sub>2</sub>, H)-  
steht.

Alk<sub>3</sub> und Alk<sub>4</sub> unabhängig voneinander für eine gerade oder verzweigte Alkylen-Gruppe mit 1 bis 20 C-Atomen, insbesondere 1 bis 6 C-Atomen, stehen, wobei die Summe der C-Atome in den Alkylen-Gruppen  $\leq 20$  ist, und  
5 Alk<sub>3</sub> und Alk<sub>4</sub> unabhängig voneinander auch für eine direkte Bindung stehen können, falls X für eine Phenylengruppe steht.

4. Verfahren nach Anspruch 3,  
dadurch gekennzeichnet,  
10 daß man als Verbindung der allgemeinen Formel I Cysteamin, insbesondere in Form seines Hydrochlorids, einsetzt.
5. Verfahren nach Anspruch 2,  
dadurch gekennzeichnet,  
15 daß man als Quelle für Ammoniumionen ein Ammoniumsalz oder Ammoniak einsetzt und daß man die Amidierung mit Hilfe von N-Succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionat (SPDP) durchführt und so die Carbonylgruppe in eine -CH<sub>2</sub>-NH-C(O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-SH-Gruppe überführt.
- 20 6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß man die reduktive Aminierung in Stufe a) in Gegenwart von Natriumcyanborhydrid (NaCNBH<sub>3</sub>) durchführt.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6,  
25 dadurch gekennzeichnet, daß man in der Stufe b) einen Träger einsetzt, der  
i) mindestens eine Thiol- oder Disulfid-Gruppe trägt oder in den mindestens eine derartige Gruppe zuvor eingeführt worden ist, so daß die Thiol-Gruppe des Konjugats zusammen  
30 mit der Thiol- oder Disulfid-Gruppe des Trägers eine Disulfidbrücke bildet.  
ii) eine Maleinimideinheit enthält und mit der Thiol-Gruppe des Konjugats in einer Art Michaeladdition eine Thioetherbrücke bildet, oder

111) eine funktionelle Gruppe, insbesondere eine Iodacetylgruppe, trägt, die durch die Thiolgruppe des Konjugats unter Bildung einer Thioethergruppe substituiert wird, wodurch das Konjugat kovalent an den Träger gekoppelt wird.

- 5  
8. Verfahren nach Anspruch 7,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß man in Schritt i) entweder den Träger mit N-Succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionat (SPDP) aktiviert und  
10 dann mit dem eine Thiol-Gruppe tragenden Konjugat umsetzt oder  
daß man das eine Thiol-Gruppe tragende Konjugat mit 2-(oder 4-)Dipyridyl-disulfid aktiviert und dann mit dem eine Thiol-Gruppe tragenden Träger umsetzt.
- 15 9. Verfahren zum Einführen eines eine Thiol-Gruppe tragenden Kopplungsgliedes in Kohlenhydrate oder in eine Kohlenhydrateinheit enthaltende Verbindungen unter Bildung eines Kohlenhydrat-Kopplungsglied-Konjugates  
dadurch gekennzeichnet,  
20 daß man ein Kohlenhydrat, das über eine freie oder halb-acetalisch gebundene Aldehydgruppe verfügt, oder eine Verbindung, deren Kohlenhydrateinheit eine derartige Aldehydgruppe besitzt, einsetzt und diese Aldehydgruppe gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6 reduktiv aminiert und  
25 das Kohlenhydrat oder die Kohlenhydrateinheit über die dabei eingeführte Aminogruppe an ein eine Thiol-Gruppe tragendes, organisches Kopplungsglied bindet.



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/EP 91/01916

<b>I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> (If several classification symbols apply, indicate all) *		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC		
Int. Cl. <sup>5</sup> C 07 K 3/08, C 07 K 17/06//G 01 N 33/53, A 61 K 47/48		
<b>II. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum Documentation Searched *		
Classification System	Classification Symbols	
Int. Cl. <sup>5</sup>	C 07 K; C 07 H; G 01 N; A 61 K	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched *		
<b>III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT *</b>		
Category *	Citation of Document, <sup>11</sup> with indication, where appropriate, of the relevant passages <sup>12</sup>	Relevant to Claim No. <sup>13</sup>
X	US, A 4529712 (YI-HER JOU ET AL.) 16 July 1985, see column 1, line 51 - column 2, line 38; column 4, line 20 - line 42; column 5, line 1 - line 28	1-3,5-9
Y	—	4
X	WO, A1, 9006774 (XOMA CORPORATION) 28 June 1990, see page 1, line 12 - line 18, claim 12	1-3,7,9
Y	—	4
X	EP, A2, 0240200 (CETUS CORPORATION) 7 October 1987, see abstract	1-3,7,9
Y	—	4
Y	US, A, 4587044 (PAUL S. MILLER ET AL.) 6 May 1986, see abstract, column 3, line 65 - column 4, line 36	4
./.		
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>* Special categories of cited documents: <sup>10</sup></p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"d" document member of the same patent family</p> </div> </div>		
<b>IV. CERTIFICATION</b>		
Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Mailing of this International Search Report	
14 January 1992 (14.01.92)	31 January 1992 (31.01.92)	
International Searching Authority	Signature of Authorized Officer	
EUROPEAN PATENT OFFICE		

## III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)

Category *	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No
A	SPDP Heterobifunctional reagent, Pharmacia fine Chemicals AB, 1978, see the whole document <hr/>	1-9

**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT  
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO. PCT/EP 91/01916**

SA 51835

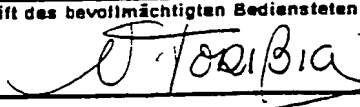
This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report.  
The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 30/11/91  
The European Patent office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US-A- 4529712	16/07/85	CA-A- 1197777	10/12/85
WO-A1- 9006774	28/06/90	AU-D- 4849190	10/07/90
		CA-A- 2006629	22/06/90
		EP-A- 0454726	06/11/91
EP-A2- 0240200	07/10/87	JP-A- 62252759	04/11/87
		US-A- 4797491	10/01/89
		US-A- 5034514	23/07/91
US-A- 4587044	06/05/86	NONE	

For more details about this annex : see Official Journal of the European patent Office, No. 12/82

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP 91/01916

<b>I. KLASSIFIKATION DES ANMELDUNGSGENSTANDS</b> (bei mehreren Klassifikationssymbolen sind alle anzugeben) <sup>5</sup>		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC Int.Cl. <sup>5</sup> C 07 K 3/08, C 07 K 17/06//G 01 N 33/53, A 61 K 47/48		
<b>II. RECHERCHIERTE SACHGEBIETE</b>		
Recherchierter Mindestprüfstoff <sup>7</sup>		
Klassifikationssystem	Klassifikationssymbole	
Int.Cl. <sup>5</sup>	C 07 K; C 07 H; G 01 N; A 61 K	
Recherchierte nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen <sup>8</sup>		
<b>III. EINSCHLÄGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN</b> <sup>9</sup>		
Art *	Kennzeichnung der Veröffentlichung <sup>11</sup> , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile <sup>12</sup>	Betr. Anspruch Nr. <sup>13</sup>
X	US, A, 4529712 (YI-HER JOU ET AL.) 16 Juli 1985, siehe Spalte 1, Zeile 51 - Spalte 2, Zeile 38; Spalte 4, Zeile 20 - Zeile 42; Spalte 5, Zeile 1 - Zeile 28	1-3,5-9
Y	--	4
X	WO, A1, 9006774 (XOMA CORPORATION) 28 Juni 1990, siehe Seite 1, Zeile 12 - Zeile 18, Anspruch 12	1-3,7,9
Y	--	4
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 48%;"> <p>* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen<sup>10</sup> :</p> <p>"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)</p> <p>"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p> </div> <div style="width: 48%;"> <p>"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</p> <p>"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist</p> <p>"&amp;" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p> </div> </div>		
<b>IV. BESCHEINIGUNG</b>		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts	
14. Januar 1992	21. 01. 92	
Internationale Recherchenbehörde	Unterschrift des bevollmächtigten Bediensteten	
Europäisches Patentamt	 J. TORIBIO	

III. EINSCHLÄGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN (Fortsetzung von Blatt 2)		
Art	Kennzeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EP, A2, 0240200 (CETUS CORPORATION) 7 Oktober 1987, Siehe die Zusammenfassung	1-3,7,9
Y	--	4
Y	US, A, 4587044 (PAUL S. MILLER ET AL.) 6 Mai 1986, Siehe die Zusammenfassung, Spalte 3, Zeile 65 - Spalte 4, Zeile 36	4
A	-- SPDP Heterobifunctional reagent, Pharmacia Fine Chemicals AB, 1978, Insgesamt	1-9
	-- -----	

# ANHANG ZUM INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHT ÜBER DIE INTERNATIONALE PATENTANMELDUNG NR.PCT/EP 91/01916

SA 51835

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten internationalen Recherchenbericht angeführten Patentdokumente angegeben.  
Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am 30/11/91  
Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US-A- 4529712	16/07/85	CA-A- 1197777	10/12/85
WO-A1- 9006774	28/06/90	AU-D- 4849190	10/07/90
		CA-A- 2006629	22/06/90
		EP-A- 0454726	06/11/91
EP-A2- 0240200	07/10/87	JP-A- 62252759	04/11/87
		US-A- 4797491	10/01/89
		US-A- 5034514	23/07/91
US-A- 4587044	06/05/86	KEINE	

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang : siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamts, Nr.12/82